Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 1, Spring 2019, p. 121-132

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۱۳۲-۱۲۱

افزایش حساسیت کیت الایزای گلیکوپروتئین مرتبط با آبستنی به‌منظور تشخیص سریع‌تر آبستنی در گاو شیری

علیرضا ایوبی[1]- ملک شاکری[2]*- مهدی ژندی[3]- هدایت الله قورچیان[4]

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۹

چکیده

تشخیص سریع آبستنی یکی از فاکتورهای کلیدی مؤثر در افزایش بازدهی تولیدمثل در گاوهای شیری است. گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی توسط جفت گاوهای آبستن تولید و تراوش می‌شوند و در سال‌های اخیر در تشخیص آبستنی گاو مورداستفاده قرارگرفته‌اند. با توجه به محدود شدن روش سونوگرافی و سایر روش‌های مورداستفاده به حدود روز ۳۰ پس از تلقیح، هدف از این پژوهش کاهش زمان تشخیص آبستنی با استفاده از نانوکیت تشخیص گلیکوپروتئین مرتبط با آبستنی بود. برای این منظور، یک نانوکیت الایزای ساندویچی برای تشخیص گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی طراحی و ساخته شد. نانوذرات مگنت به‌منظور افزایش سطح تماس بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن مورداستفاده قرار گرفت و از ویژگی میل اتصال‌پذیری بالا بین استرپتاویدین و بیوتین برای اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات استفاده شد. در این پژوهش تعداد ۵۸ گاو شیری نژاد هلشتاین انتخاب و تکنیک همزمان‌سازی و تلقیح مصنوعی انجام شد. نمونه‌های خون گاوها از روز ۱۸ تا ۳۰ پس از تلقیح روزانه جمع‌آوری و پس‌از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌های پلاسمای خون جداسازی شد و وضعیت آبستنی در روز ۳۰ و ۶۰ آبستنی به ترتیب با استفاده از سونوگرافی و لمس راست‌روده بررسی شد. غلظت گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی در نمونه‌های پلاسما با استفاده از نانوکیت اندازه‌گیری و با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز شد. نتایج نشان داد، غلظت گلیکوپروتئین‌ها از روز ۲۱ تا ۳۰ پس از تلقیح به‌صورت وابسته به روز در گاوهای آبستن افزایش می‌یابد. همچنین اولین افزایش چشمگیر در غلظت گلیکوپروتئین‌ها در روز ۲۳ پس از تلقیح مشاهده شد و گاوهایی که تا روز ۶۰ پس از تلقیح آبستن تشخیص داده شدند، در روز ۲۴ پس از تلقیح غلظت گلیکوپروتئین بیشتری در مقایسه با گاوهای غیرآبستن داشتند (به ترتیب ng/ml ۲/۲۸±۰/۱۵ و ۰/۷±۰/۱۸). بر اساس این نتایج، غلظت گلیکوپروتئین در روز ۲۴ آبستنی می‌تواند نشانه‌ای زودهنگام از وضعیت آبستنی در گاوهای شیری باشد. بااین‌حال، مطالعات بیشتری لازم است تا کارایی این روش تأیید شود.

واژه‌های کلیدی: آبستنی، سقط جنین، گاو شیری، گلیکوپروتئین، نانوکیت.

مقدمه

صنعت گاوداری به دلیل تنوع محصولات و بازدهی بهتر تولیدمثلی، بیشتر از سایر صنایع پرورشی دام موردتوجه فعالان این صنعت قرارگرفته است. در مبحث مدیریت تولیدمثل در گله‌های گاو شیری، تشخیص دقیق و سریع آبستنی ازنظر به دست آوردن و حفظ حداکثر بازدهی تولیدمثل حائز اهمیت است. تشخیص زودهنگام آبستنی باعث شناسایی سریع گاوهای غیرآبستن و برنامه‌ریزی برای آبستنی مجدد آن‌ها در گله می‌شود (۱۱). تأخیر در تشخیص آبستنی سبب افزایش روزهای باز و فاصله گوساله‌زایی در گاو می‌شود. مطالعات نشان داد، در گاوهای پر تولید چنانچه گاوها تا روز ۱۱۰ پس از زایمان آبستن نشوند، ضرر و زیان اقتصادی روزانه حدود ۲۵۴۰۰۵ ریال به ازای هر گاو به دامدار تحمیل خواهد شد (۲۱) که این مبلغ در دامداری‌های صنعتی بزرگ مبلغ چشمگیری است.

تولید و ترشح گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی (PAG[1]) توسط جفت در اوایل دوران آبستنی، یکی از عوامل مهم در توسعه آزمایش‌های تشخیص آبستنی در اوایل آبستنی می‌باشد (۱۲). علاوه بر کاربرد این نوع گلیکوپروتئین‌ها در تشخیص آبستنی، یکی دیگر از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران،
۴- استاد مرکز بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mshaker@ut.ac.ir)
DOI: 10.22067/ijasr.v11i1.72079

1-Pregnancy associated glycoproteins (PAGs)

کاربردهای آن‌ها استفاده در پیش‌بینی احتمال از دست رفتن آبستنی است به‌نحوی‌که کاهش غلظت گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی در روز ۲۸ پس از تلقیح در مقایسه با گاو آبستن می‌تواند در پیش‌بینی از دست رفتن آبستنی مفید باشد (۱۷). باوجود استفاده از گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی در تشخیص آبستنی و پیش‌بینی احتمال از دست رفتن آبستنی، عملکرد فیزیولوژی آن‌ها هنوز مشخص نشده است (۱۹).

سلول‌های دو هسته‌ای و تک‌هسته‌ای ترفوبلاست حین تمایز و بلوغ، گرانول‌های ترشحی ویژه‌ای تولید می‌کنند که دارای برخی پروتئین‌های جفت ازجمله انواع PAG می‌باشند (۷). اغلب مطالعات گزارش کردند که در گاوهای آبستن، غلظت انواع PAG از روز ۱۵ تا ۳۵ آبستنی افزایش می‌یابد، بااین‌حال، تنوع در سطوح PAG سرم در میان حیوانات و در نژادهای مختلف، مانع از اندازه‌گیری PAG به‌عنوان یک شاخص قابل‌اعتماد از آبستنی تا حدود ۳۰ روز پس از آبستنی می‌شود (۱۲). تاکنون حدود ۲۲ عضو از خانواده PAG شناسایی‌شده‌اند. پروتئین B و یا PAG1 اولین عضو از اعضای این خانواده است که مطالعات زیادی برای اندازه‌گیری آن در خون و شیر انجام‌شده است (۲۷). در حال حاضر، چند نمونه کیت الایزا برای اندازه‌گیری غلظت PAG1 و درنتیجه تشخیص آبستنی تولیدشده است به‌طوری‌که تشخیص آبستنی در روز ۳۰ پس از تلقیح را ممکن می‌سازد (۱۸). مطالعات مقایسه‌ای روش سونوگرافی با روش الایزا و رادیوایمینواسی در تشخیص PAG1 نتایج مشابهی در تشخیص آبستنی در روز ۲۹ پس از تلقیح نشان داد هرچند تفاوت‌هایی در تشخیص دام‌های غیرآبستن در برخی روش‌ها مشاهده شد (۱۲، ۲۵).

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات در ساخت ایمینوحسگرها سبب افزایش حساسیت ایمینوحسگرها و درنتیجه افزایش ردیابی واکنش آنتی‌ژن– آنتی‌بادی شده است. نانوذرات مغناطیسی به‌عنوان یک حامل آنتی‌بادی در آزمایشگاه‌های بالینی به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار می‌گیرند. نانوذرات مغناطیسی دارای مزایای متعددی از جمله: جداسازی آسان و متمرکز کردن مولکول‌های مورد هدف در واکنش مخلوط توسط یک آهنربا؛ نسبت بسیار بالای سطح به حجم برای افزایش مقدار بیومولکول‌های بارگذاری شده؛ واکنش سریع بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و کوچک‌سازی آسان است (۱۵).

با توجه به اهمیت تشخیص سریع آبستنی برای دامدار و محدودیت کیت‌های موجود در بازار و روش سونوگرافی به حدود روز ۳۰ پس از تلقیح، هدف از انجام این پژوهش طراحی و ساخت نانوکیتی بود تا بتوان با استفاده از نانوذرات و درنتیجه افزایش حساسیت کیت الایزا، غلظت‌های پایین‌تر PAG1 را اندازه‌گیری کرد و احتمالاً بتوان زمان تشخیص آبستنی را کاهش داد.

مواد و روش‌ها

دام‌ها

تعداد ۵۸ گاو شیری نژاد هلشتاین در دو گروه تلیسه‌ها (n=۳۲) و گاوهای چند شکم زایش (n=۲۶) متعلق به گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در این مطالعه از ابتدای آبان ماه ۱۳۹۵ وارد طرح شدند. گاوهای شیری سه بار در روز دوشش می‌شدند و میانگین تولید شیر در آن‌ها ۳/۶ ± ۳۲/۷ کیلوگرم بود و تمام گاوها در روز ۳۰ پس از تلقیح میانگین نمره بدنی ۳/۵ داشتند.

همزمان‌سازی تخمک‌ریزی و تلقیح مصنوعی

به‌منظور همزمان‌سازی تخمک‌ریزی، روش همزمانی اووسینک استفاده شد. به‌طور خلاصه، بر اساس پروتکل اووسینک تمام گاوها اولین تزریق GnRH را دریافت کردند (حداقل دو ماه پس از زایمان در گاوهای چند شکم زایش) و ۷ روز بعد پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ ($PGF2\alpha$) به تمام گاوها تزریق شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق $PGF_{2\alpha}$، دومین تزریق GnRH انجام شد و از حدود ۱۶ تا ۲۰ ساعت پس‌ازآن گاوها تلقیح شدند. وضعیت آبستنی گاوهای تلقیح شده با استفاده از روش سونوگرافی در روز ۳۰ و لمس راست‌روده در روز ۶۰ پس از تلقیح توسط تکنسین باسابقه گاوداری انجام شد.

جمع‌آوری نمونه‌های خون

نمونه‌های خون از تمام گاوهای تلقیح شده (۵۸ =n) از روز ۱۸ تا ۳۰ پس از تلقیح، به‌طور روزانه و از طریق سیاهرگ دمی جمع‌آوری شد و در داخل لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های پلاسمای خون پس‌ازآنتقال به آزمایشگاه با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد و نمونه‌های پلاسما در چند میکروتیوب و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌منظور آنالیز غلظت PAG1 ذخیره شد.

ساخت نانوکیت

به‌منظور مقایسه بهتر کیت تجاری با نانوکیت، در ساخت نانوکیت از مواد مشابه کیت تجاری استفاده شد تا میزان خطا کاهش یابد. کیت حاضر از نوع ساندویچی الایزا بود و در ساخت آن از دو نوع آنتی‌بادی منوکلونال (آنتی‌بادی اولیه) و پلی‌کلونال (آنتی‌بادی ثانویه) استفاده شد. آنزیم مورداستفاده، آنزیم Horseradish peroxidase (HRP) بیوتینه شده بود. برای اتصال آنتی‌بادی و آنزیم به نانومگنت از قابلیت تمایل اتصال بالا بین استرپتاویدین و بیوتین استفاده شد. نانومگنت استرپتاویدینه قبل از استفاده و بر اساس پروتکل شرکت سازنده آماده شد. به‌طور خلاصه ابتدا با استفاده از شیکر نانو مگنت‌ها

در داخل محلول بافر به‌طور کامل پراکنده شدند و سپس ۵۰۰ میکرو لیتر از این محلول به داخل میکروتیوب انتقال یافت. در ادامه با استفاده از آهنربا نانومگنت‌ها بر روی دیواره میکروتیوب و در مقابل آهنربا تجمع یافت (۶۰ ثانیه) و با استفاده از پیپت، محلول داخل میکروتیوب خارج شد. پس از جداکردن آهنربا حدود ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (بافر فسفات سالین یا PBS (۷/۴ pH=) به همراه ۰/۰۲ درصد توئین ۲۰) به میکروتیوب اضافه شد و با استفاده از پیپت نانومگنت‌ها پراکنده شدند. مجدداً میکروتیوب در مجاورت آهنربا قرار گرفت و عمل جداسازی بافر شستشو و پراکنده کردن مجدد تا سه مرتبه تکرار شد. در ادامه و برای اتصال ترکیبات بیوتینه (شامل آنتی-بادی ثانویه بیوتینه و آنزیم HRP بیوتینه) و تولید ترکیب نانو مگنت–آنتی‌بادی– آنزیم که بخش اصلی ساختار نانوکیت را تشکیل می‌دهد، مطابق دستورالعمل شرکت و روش گزارش‌شده در مطالعات قبلی عمل شد (۲۹، ۳۰) به‌طور خلاصه ۳۰۰ میکرو لیتر آنزیم بیوتینه با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی بیوتینه به ۵۰۰ میکرولیتر محلول حاوی نانومگنت پوشیده شده با استرپتاویدین اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت و در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. درنهایت مخلوط به‌دست‌آمده با مگنت جدا شد و پس از سه بار شستشو با بافر شستشو، برای استفاده در مراحل بعدی در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۳۰).

روش اندازه‌گیری غلظت PAG1

غلظت PAG1 نمونه‌های پلاسما با استفاده از کیت تجاری موجود (Bioassay Technology, Cat.No : E0316B0, China) در بازار و نانوکیت ساخته‌شده در این پژوهش، اندازه‌گیری شد. اندازه-گیری غلظت PAG1 در هنگام استفاده از کیت تجاری بر اساس دستورالعمل کیت و توسط تکنسین آزمایشگاه انجام شد. به‌طور خلاصه، روش اندازه‌گیری غلظت PAG1 با استفاده از نانوکیت به شرح ذیل بود (۲۸).

در ابتدا آنتی‌بادی اولیه (۱۰۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و درب چاهک‌ها با یک درپوش پلاستیکی پوشیده شد و به مدت یک شبانه‌روز در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه چاهک‌ها سه مرتبه با بافر (Tris-HCl) با توئین ۲۰ پنج درصد) شستشو داده شد و سپس به‌منظور مسدود کردن نقاطی که آنتی‌بادی متصل نشده است به هر چاهک آلبومین سرم گاوی ۵ درصد اضافه شد و چاهک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت با درپوش پوشانده شد. پس‌ازآن نمونه‌های پلاسما در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۴ مرحله شستشوی چاهک‌ها، مجموعه آنتی‌بادی ثانویه–آنزیم– نانومگنت که از قبل آماده‌شده بود و در یخچال نگهداری می-شد به چاهک‌ها اضافه شد و مشابه مرحله قبل و با همان شرایط به مدت یک ساعت نگهداری شد. پس از گذشت یک ساعت محلول داخل چاهک‌ها تخلیه شد و چاهک‌ها با استفاده از بافر شستشو چهار مرحله شستشو داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB) در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه شد. در پایان با اضافه کردن محلول متوقف کننده واکنش (۵۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک (HCl) در هر چاهک واکنش متوقف شد. جذب نوری با دستگاه الایزا ریدر (Hiperion-model: MPR4+) در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و با رفرانس فیلتر ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و قرائت شد (۲۸).

آنالیز آماری

تمام داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه‌شده است و تفاوت در غلظت PAG1 در نمونه‌های پلاسما که از روز ۱۸ تا ۳۰ آبستنی به‌صورت روزانه جمع‌آوری‌شده بود به‌صورت داده‌های تکرار شده در زمان با رویه MIXED و با نرم‌افزار SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) تجزیه‌وتحلیل شد. نمونه‌های مربوط به غلظت روز ۲۴ با رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از LSmeans و در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد. بر اساس عملکرد گوساله¬زایی، نتایج غلظت PAG1 به صورت ذیل محاسبه شد: تشخیص مثبت صحیح (a)، تشخیص مثبت کاذب (b)، تشخیص منفی صحیح (c) و تشخیص منفی کاذب (d). بر اساس نتایج فوق اختصاصیت (c/c + b × 100)، حساسیت (a/a + d × 100)، ارزش پیش‌بینی مثبت (a/a + b × 100)، ارزش پیش‌بینی منفی (c/c + d × 100) و درنهایت دقت کلی (a + c/a + b + c + d × 100) نانوکیت محاسبه شد.

نتایج و بحث

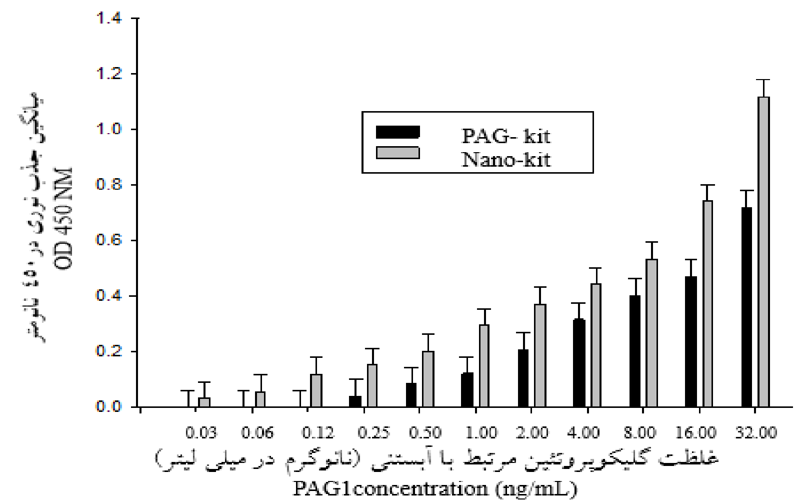
همزمان‌سازی و وضعیت آبستنی

با انجام روش اووسینک، از تعداد ۵۸ گاو ۴ گاو به روش اووسینک پاسخ ندادند و از تمام آنالیزهای آماری حذف شدند. بااین‌حال ۴۸ درصد (۲۶ از ۵۴) از گاوها در روز ۳۲ پس از تلقیح با استفاده از سونوگرافی آبستن تشخیص داده شدند. از روز ۳۲ تا ۶۰ پس از تلقیح ۷۳ درصد (۱۹ از ۲۶) از گاوها آبستن باقی ماندند و مقدار آبستنی ازدست‌رفته در فاصله ۳۲ تا ۶۰ پس از تلقیح و با استفاده از روش بازرسی راست‌روده حدود ۱۷ درصد (۷ از ۲۶) بود. در کل وضعیت آبستنی در زمان استفاده از روش اووسینک تا پایان روز ۱۰۰ پس از تلقیح ۳۵ درصد (۱۹ از ۵۴) بود. مقدار آبستنی ازدست‌رفته در مطالعات انجام‌شده متفاوت گزارش‌شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ انجام شد نرخ از دست رفتن آبستنی در

بازه زمانی ۳۰ تا ۹۰ روز پس از تلقیح ۴/۸–۱۱/۴ درصد گزارش شد درحالی‌که در مطالعات دیگر طی روزهای ۳۲ تا ۴۸ پس از تلقیح ۷/۷ درصد آبستنی‌ها ازدست‌رفته بود (۲، ۵، ۱۴). مطالعه دیگری که از سونوگرافی و لمس راست‌روده برای شناسایی آبستنی استفاده کرده بود نرخ ازدست‌رفتن آبستنی در ۵۱۲ گاو در امریکای شمالی و در بازه زمانی ۳۲ تا ۶۰ پس از آبستنی را ۱۷ درصد گزارش کرد (۱۰). در همان سال و در گزارشی دیگر نرخ از دست رفتن آبستنی در بازه ۳۲ تا ۲۶۰ پس از تلقیح ۱۴/۱ درصد گزارش‌شده است (۳). اخیراً در گزارشی نرخ از دست‌رفتن آبستنی در بازه زمانی ۲۴ تا ۳۱ و ۳۱ تا ۵۹ روز پس از تلقیح به ترتیب ۲۰/۸ و ۱۹/۸ درصد گزارش‌شده است (۱۷). در همین مطالعه، گزارش شد اکثر آبستنی‌های از دست‌رفته پس از روز ۳۱، طی روزهای ۳۱ تا ۳۸ پس از تلقیح اتفاق می‌افتد. در این بازه غلظت گلیکوپروتئین‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند ولی علت این کاهش هنوز مشخص نشده است (۱۷). با توجه به همزمان‌شدن کاهش ترشحات جفت (PAG) و افزایش نرخ مرگ‌ومیر جنین، این‌طور تصور می‌شود که علت مرگ‌ومیر جنین می‌تواند نارسایی و نقص جفت باشد (۱).

روند تغییرات PAG1

اندازه‌گیری غلظت‌های مختلف PAG1 (استانداردها) با استفاده از کیت تجاری و نانوکیت نشان داد که نانوکیت حساسیت بیشتری نسبت به کیت تجاری دارد و غلظت ۰/۰۳ ng/mL را تشخیص می‌دهد درحالی‌که در کیت تجاری این دقت تشخیص وجود نداشت (شکل ۱). یکی از دلایل اختلاف در قدرت تشخیص، حساسیت بیشتر نانوکیت است چراکه به ازای اتصال هر آنتی‌بادی به آنتی‌ژن تعداد بیشتری آنزیم در فرآیند دخالت دارند که این می‌تواند سبب افزایش جذب نوری ثبت‌شده توسط الایزا خوان و درنتیجه تشخیص غلظت‌های خیلی پایین PAG1 در مقایسه با کیت تجاری شود (۲۸) و این در حالی است که در کیت تجاری به ازای اتصال هر آنتی‌بادی به آنتی‌ژن یک آنزیم در فرآیند دخالت دارد و این سبب کاهش جذب نوری ثبت‌شده توسط الایزا خوان می‌شود. دلایل دیگر این اختلاف مربوط به نوع آنتی‌بادی (مونوکلونال یا پلی‌کلونال) استفاده‌شده و نوع PAG است که توسط آنتی‌بادی شناسایی می‌شود (۶).



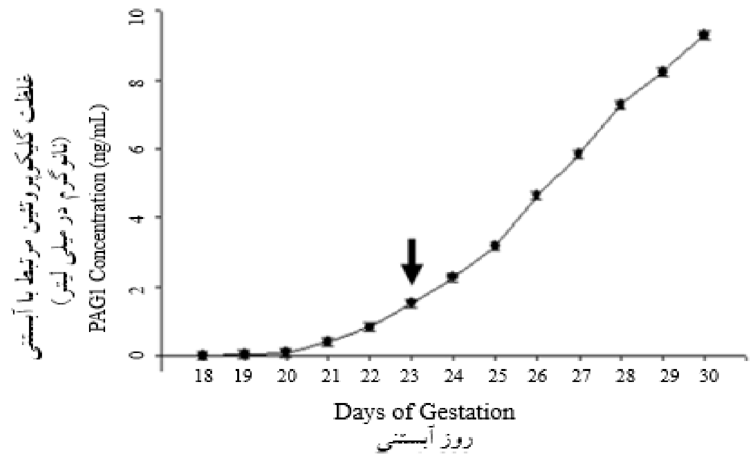
شکل ۱ – تفاوت در میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده با استفاده از دو کیت تجاری و نانوکیت در غلظت‌های مختلف PAG1

Figure 1- Comparison of commercial kit and nano-kit in measuring various concentration of PAG1

به‌منظور بررسی روند تغییرات روزانه غلظت PAG1 پلاسما از روز ۱۸ تا ۳۰ پس از تلقیح، نمونه‌های پلاسمای مربوط به گاوهایی که تا روز ۶۰ پس از تلقیح آبستن ماندند (تعداد ۱۲ گاو شامل ۶ تلیسه و ۶ گاو چندشکم زایش) با استفاده از نانوکیت اندازه‌گیری شد (شکل ۲). اولین افزایش در غلظت PAG1 در پلاسمای خون گاوهای آبستن از روز ۲۳ شروع شد و این روند افزایشی تا روز ۳۰ پس از تلقیح ادامه یافت. روند تغییرات غلظت PAG1 در گاوهای آبستن از روز ۲۰ تا ۳۰ پس از تلقیح سیر صعودی داشت (شکل ۱). همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد که روند تغییرات غلظت PAG1 پلاسما در گاوهای آبستن تحت تأثیر روز آبستنی قرار دارد ($P < 0/001$).

شکل ۳ روند تغییرات غلظت PAG1 در گاوهای آبستن و گاوهایی که تا روز ۶۰ آبستن باقی نماندند را نشان می‌دهد. در روز ۲۲ پس از تلقیح بین گاوهای که تا روز ۶۰ پس از تلقیح آبستن ماندند در مقایسه با گاوهایی که آبستنی آن‌ها ازدست‌رفته بود غلظت PAG1 تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳). غلظت PAG1 در روز ۲۴ بین گاوهایی که در بازه زمانی روز ۳۰ آبستن تا روز ۶۰ پس از تلقیح

آبستن ماندند در مقایسه با گاوهایی که در بازه ۳۲ تا ۶۰ پس از تلقیح آبستنی آن‌ها ازدست‌رفته بود، تفاوت معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۵) و گاوهایی که دارای غلظت PAG1 بیش از ng/mL ۱/۹۳ بودن با ۹۵ درصد اطمینان تا روز ۶۰ پس از تلقیح آبستن باقی ماندند. همچنین غلظت PAG1 در گاوهای آبستن در روز آبستنی ۲۴ (۰/۱۲ng/mL ±۲/۲۸) در مقایسه با روز ۳۰ آبستنی (ng/mL ۰/۱۲ ± ۹/۳۰) تفاوت معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۴).



شکل ۲- میانگین (±SE) غلظت PAG1 در نمونه‌های پلاسما از روز ۱۸ تا ۳۰ آبستنی در گاوهای شیری هلشتاین که در روز صفر تلقیح شدند و در روز ۳۰ آبستنی جنین زنده داشتند. اولین افزایش در غلظت PAG1 در روز ۲۳ آبستنی اتفاق افتاد (P < ۰/۰۵).

Figure 2- Mean (±SE) plasma concentrations of PAG1 from day 18 to 30 of gestation in Holstein dairy cows that received AI on day 0 and had a viable embryo on day 30 of gestation. The first increase in PAG1 concentration occurred on day 22 of gestation (P<0.05).

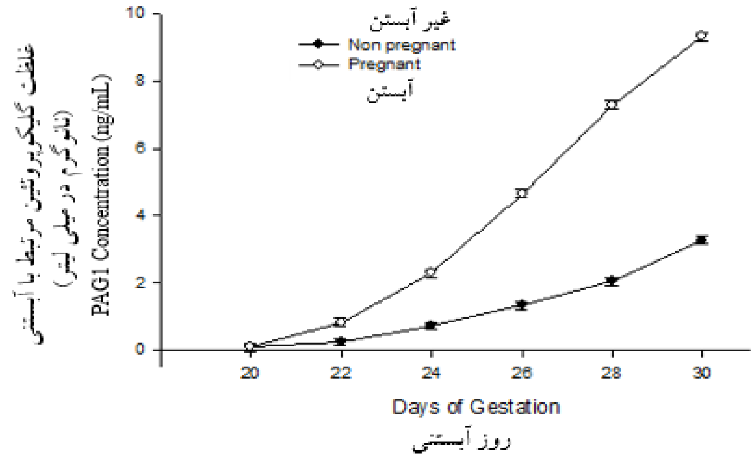
روند تغییرات غلظت PAG1 در این مطالعه تقریباً مشابه گزارش‌هایی بود که روند تغییرات PAG1 سرم را در گاوهای آبستن گزارش کرده بودند. در اولین مطالعه در این زمینه گزارش شد که در بعضی از گاوها و نه در همه آن‌ها غلظت PAG1 مشاهده‌شده در سرم خون گاوها از روز ۱۵ تا ۳۲ آبستنی روند افزایشی داشت و در ادامه غلظت آن تا روز ۶۰ پس از تلقیح کاهش یافت و از روز ۶۵ تا آخر آبستنی به‌طور پیوسته غلظت آن افزایش یافت (۲۳). روند تغییراتی مشابهی توسط لاسون و همکاران (۲۰۱۴) که از کیت الایزای مشابهی استفاده کرده بودند نیز گزارش‌شده است (۱۳). مطالعات ریچی و همکاران (۲۰۱۵) نیز روند تغییراتی مشابهی را در پلاسما و شیر گاوهای شیری نشان داد. در این تحقیق گزارش شد که روند تغییرات غلظت گلیکوپروتئین در شیر مشابه پلاسمای خون است با این تفاوت که غلظت آن در شیر نصف غلظت گلیکوپروتئین‌ها در پلاسمای خون است (۲۲).

در شکل ۵ نتایج مربوط به بررسی وضعیت آبستنی با استفاده از دو کیت تجاری و نانوکیت در روز ۳۰ پس از تلقیح (روز استاندارد توصیه‌شده در کیت تجاری) نشان داده‌شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است غلظت PAG1 اندازه‌گیری شده توسط دو کیت در روز ۳۰ تفاوت معنی‌داری نداشت و این نشان می‌دهد که استفاده از کیت گلیکوپروتئین در تشخیص آبستنی می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر روش‌های مرسوم باشد و شرکت‌های مختلفی اقدام به تولید این سری از کیت‌ها کرده‌اند و سه نمونه از آن‌ها به‌صورت تجاری در بازار موجود است (۲۰).

پس از بررسی داده‌ها و مشخص شدن روز ۲۴ به‌عنوان بهترین زمان تشخیص آبستنی با استفاده از PAG1، غلظت PAG1 نمونه‌های پلاسمای خون گاوهای تلقیح شده، در روز ۲۴ آبستنی اندازه‌گیری و داده‌های مربوطه به‌منظور تعیین وضعیت آبستنی آنالیز شد (شکل ۶). غلظت PAG1 در روز ۲۴ در گاوهایی که بر اساس غلظت پروژسترون آبستن تشخیص داده شدند و تا روز ۳۰ پس از تلقیح آبستن ماندند ng/mL ۰/۰۵± ۲/۵۱ بود. گاوهایی که در روز ۲۴ آبستن تشخیص داده شدند ولی در روز ۳۰ پس از تلقیح آبستن نبودند غلظت PAG1 پلاسمای خون آن‌ها در روز ۲۴ پس از تلقیح ng/mL ۰/۰۶± ۱/۰۳ بود (شکل ۶). همچنین غلظت PAG1 در روز ۲۴ آبستنی در گاوهایی که در روز ۲۴ و ۳۰ پس از تلقیح آبستن بودند در مقایسه با گاوهایی که در روز ۲۴ آبستن تشخیص داده شدند و تا روز ۳۰ پس از تلقیح آبستن نماندند تفاوت معنی‌داری داشت (P ۰/۰۰۰۱ >). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ در تلیسه‌های دریافت‌کننده جنین انجام شد نتایج نشان داد که چنانچه غلظت گلیکوپروتئین‌ها در روز ۲۴ آبستنی بیش از ng/mL ۱/۳۹ باشد دقت تشخیص آبستنی با استفاده از گلیکوپروتئین‌ها بیش از ۹۲ درصد است (۱۹). در مطالعه

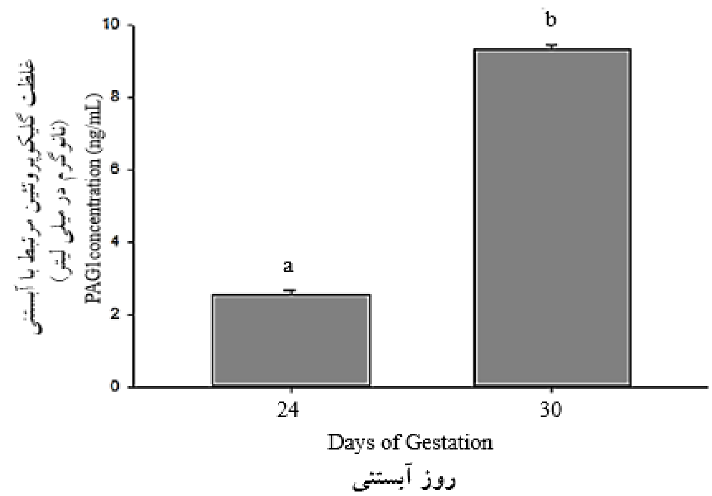
مشابهی گزارش شد که چنانچه در روز ۲۴ پس از تلقیح غلظت گلیکوپروتئین‌ها در گاو شیری بیش از ng/mL ۲/۰۲ باشد دقت تشخیص آبستنی تا روز ۵۴ آبستنی بیش از ۹۵ درصد است. همچنین غلظت کمتر از ng/mL ۰/۰۶ در روز ۲۴ پس از تلقیح در تشخیص گاوهای غیرآبستن دارای دقت ۹۵ درصد است (۹). بر اساس نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مشابه (۲۰) غلظت PAG1 در روز ۲۴ پس از تلقیح می‌تواند به‌عنوان شاخصی سریع در تشخیص زودهنگام آبستنی باشد.

به‌طورکلی و بر اساس نتایج این مطالعه، گاوهایی که در روز ۲۴ غلظت PAG1 بیش از ng/mL ۰/۰۷± ۲/۲۸ داشتند و در روز ۳۰ آبستنی غلظت PAG1 پلاسمای بیش از ng/mL ۰/۰۷± ۹/۲ داشتند تا روز ۶۰ آبستنی باقی ماندند. گاوهایی که غلظت PAG1 پلاسمای حدود ng/mL ۰/۰۷± ۱/۵۰ داشتند نیاز به چک مجدد در روز ۳۰ داشتند زیرا در روز ۳۱ آبستن ولی در روز ۶۰ غیر آبستن تشخیص داده شدند و این نتایج نشان‌دهنده آمار بالای سقط در بازه زمانی بین روز ۳۰ تا ۶۰ آبستنی است.



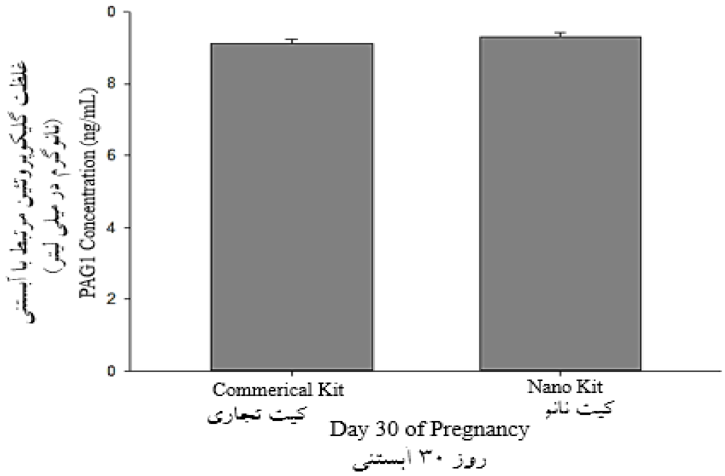
شکل ۳- میانگین (±SE) غلظت PAG1 در نمونه‌های پلاسما از روز ۲۰ تا ۳۰ آبستنی در گاوهای شیری هلشتاین که در روز صفر تلقیح شدند و در روز ۶۰ آبستن بودند و یا آبستنی آن‌ها ازدست‌رفته بود (غیر آبستن). غلظت PAG1 در روز ۲۴ بین گاوهای آبستن و گاوهایی که آبستنی آن‌ها ازدست‌رفته بود تفاوت چشمگیری داشت (P < ۰/۰۵).

Figure 3- Mean (±SE) plasma concentrations of PAG1 from day 20 to 30 of gestation in dairy cows that received AI on day 0 and was pregnant on day 60 of gestation or lost pregnancy (Nonpregnant). Concentration of PAG1 on day 24 was significantly different between pregnant and non-pregnant cows (P <0.05).



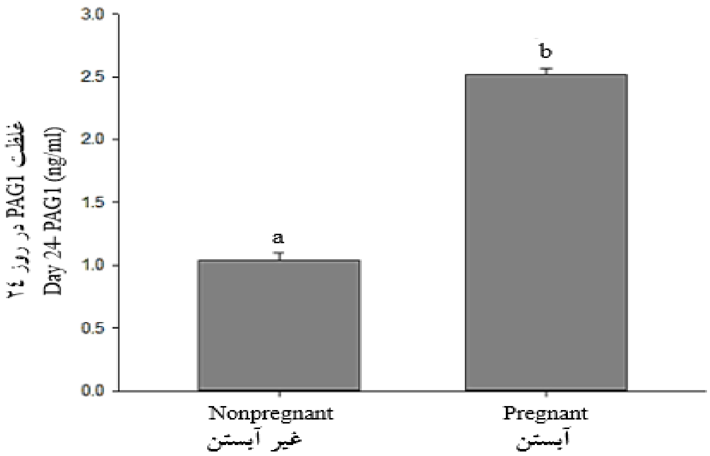
شکل ٤- میانگین (±SE) غلظت پلاسمای PAG1 اندازه‌گیری‌شده با استفاده از نانو کیت در روز ۲۴ و ۳۰ پس از تلقیح در گاوهای شیری که در روز صفر تلقیح شدند و در روز ۳۰ پس از تلقیح جنین زنده داشتند. غلظت PAG1 در روز ۲۴ در مقایسه با روز ۳۰ آبستنی تفاوت معنی‌داری داشت (P <۰/۰۰۰۱). a,b نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری است.

Figure 4- Mean (±SE) plasma concentrations of PAG1 on days 24 and 30 after AI in dairy cows that received AI on day 0 and had a viable embryo on day 30 of gestation. PAG1 concentration on day 24 had significant difference compared with day 30 of gestation (P < 0.0001). a,b denote a significant difference.



شکل ۵– میانگین (±SE) غلظت PAG1 در نمونه‌های پلاسمای گاوهای آبستن در روز ۳۰ آبستنی با استفاده از دو کیت تجاری و نانوکیت. تمام گاوهای شیری در روز صفر تلقیح شدند و در روز ۳۰ آبستنی جنین زنده داشتند.

Figure 5– Mean (±SE) plasma concentrations of PAG1 on day 30 of gestation use of both commerical kit and nano kit. All dairy cows that received AI on day 0 and had a viable embryo on day 30 of gestation.



شکل ٦– میانگین (±SE) غلظت PAG1 در روز ۲۴ آبستنی در گاوهای شیری که در روز صفر تلقیح شدند و در روز ۲۴ آبستن تشخیص داده شدند و تا روز ۳۰ آبستن ماندند و یا مرگ‌ومیر جنین را تجربه کردند. گاوهای هلشتاینی که مرگ‌ومیر جنین را تا روز ۳۰ تجربه کردند در مقایسه با گاوهایی که آبستن باقی ماندند غلظت PAG1 کمتری در روز ۲۴ آبستنی داشتند (P < ۰/۰۰۰۱). a,b نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری است.

Figure 6- Mean plasma concentrations of PAG1 (mean ± SEM) on day 24 of gestation in dairy cows that received AI on day 0 and diagnosed pregnant on day 24 of gestation and either maintained or experienced embryonic mortality by day 30. Holstein cows that experienced late embryonic mortality by day 30 of gestation had decreased (P < 0.0001) circulating concentrations of PAG1 on Day 24 compared with cows that maintained an embryo until Day 30. a,b denote a significant difference.

مرگ‌ومیر جنین در بازه ۳۰ تا ۶۰ بعد تلقیح (حدود ۱۳ تا ۲۰ درصد) در بیشتر مطالعات گزارش‌شده است (۱۸) و همچنین در این باز غلظت PAGها نیز تا روز ۶۰ پس از تلقیح کاهش می‌یابد و علت آن هنوز مشخص نشده است (۱۳). عوامل زیادی در عدم موفقیت آبستنی و کاهش غلظت PAG1 دخالت دارند که احتمالاً یکی از دلایل آن می‌تواند عدم تکامل جفت باشد (۷). نوسانات هورمونی و افزایش تولید شیر می‌تواند یکی دیگر از دلایل عدم رشد کامل جفت و درنتیجه از دست رفتن آبستنی باشد (۷، ۲۲).

بررسی داده‌های مربوط به تعیین وضعیت آبستنی در روزهای ۲۴ و ۳۰ پس از تلقیح نشان داد که حساسیت، اختصاصی بودن و دقت تشخیص آبستنی با استفاده از نانوکیت در روز ۲۴ نسبت به روز ۳۰ آبستنی به ترتیب ۹۶، ۸۵ و ۹۰ درصد بود (جدول ۱). بررسی نتایج مربوط به کیت تجاری و نانوکیت در روز ۳۰ پس از تلقیح نشان داد که کیت معمولی دارای دقت ۹۰ درصد در تشخیص آبستنی است

درحالی‌که نانوکیت دارای دقت ۹۲ درصد است (جدول ۱). بااین‌حال تعیین وضعیت آبستنی در روز ۲۴ یکی از مهم‌ترین مزیت‌های نانوکیت است چراکه زمان تشخیص آبستنی را ۶ روز کاهش می‌دهد و تشخیص آبستنی در این بازه زمانی اهمیت اقتصادی فراوانی برای دامدار دارد و از ضرر و زیان ناشی از تأخیر در آبستنی جلوگیری می‌کند بااین‌وجود مطالعات بیشتری در این زمینه موردنیاز است.

استفاده از گلیکوپروتئین‌ها در تشخیص آبستنی بسته به روش مورداستفاده و دام هدف، به‌خصوص در زمان استفاده از آنتی‌بادی‌ها متفاوت است چراکه علاوه بر متنوع بودن گلیکوپروتئین‌ها، غلظت گلیکوپروتئین‌ها در بین گاوهای با شرایط مختلف نیز متفاوت است (۱۸). همچنین شواهد قابل‌توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد PAGها دارای الگوی ترشح زمانی مجزا و متفاوتی نسبت به سایر اعضای این خانواده هستند، برخی زودتر و یا دیرتر در طی آبستنی ترشح می‌شوند و اطلاعات کمی در مورد اولین PAGهای ترشح‌شده وجود دارد (۷، ۲۶). بااین‌حال مطالعات زیادی استفاده از گلیکوپروتئین‌ها به‌عنوان یک روش مؤثر و سریع در تشخیص آبستنی را توصیه کرده‌اند (۶، ۷، ۹، ۱۷، ۱۹). البته نتایج متناقضی در برخی از مطالعات گزارش‌شده است. به‌عنوان‌مثال، در مطالعه‌ای که در آن از کیت تجاری مربوط به گلیکوپروتئین‌ها استفاده شد نتایج نشان داد دقت تشخیص آبستنی با استفاده از کیت گلیکوپروتئین در روز ۲۵ پس از تلقیح بسیار پایین است (۱۹). در مطالعه‌ای دیگری که در گاوهای گوشتی شیرده انجام شد، غلظت گلیکوپروتئین در پلاسمای خون گاوهای آبستن در روز ۲۴ آبستنی نسبت به نمونه‌های قبلی همان آزمایش افزایش معنی‌داری داشت، بااین‌حال همان گزارش و در آزمایشی دیگر نتایج نشان داد دقت این روش در تشخیص آبستنی کم است (۱۸). یکی از دلایل احتمالی این اختلاف، تفاوت در ترشح گلیکوپروتئین‌ها در روز ۲۴ آبستنی و یا روزهای قبل گزارش شد و دلیل دیگر اختلاف در نوع گلیکوپروتئین‌هایی بود که توسط این روش‌ها شناسایی شد (۷، ۸). در مطالعه‌ای که باهدف تشخیص زودهنگام غیرآبستنی با استفاده از PAGها و با اجرای پروتکل همزمان‌سازی انجام شد، پس از مشخص شدن وضعیت آبستنی و تشخیص گاوهای غیرآبستن در روز ۲۷ پس از زایش، پروتکل همزمان‌سازی مجدد انجام شد. نتیجه این تحقیق این بود که استفاده از تست تشخیص PAG به همراه اجرای پروتکل همزمان‌سازی مجدد در مقایسه با سونوگرافی نرخ آبستنی را در گله افزایش می‌دهد (۲۴).

جدول ۱- تشخیص زودهنگام آبستنی در گاوهای شیری هلشتاین با دو کیت تجاری و نانوکیت و غلظت پروژسترون در روز ۲۴ و ۳۰ پس از تلقیح مصنوعی.

Table 1- Diagnosis of early pregnancy in Holstein dairy cows by means of commercial kit and nano -kit and progesterone concentration (P4) on days 24 and 30 after AI.

Item مورد	Pregnancy diagnosis on day 24 تشخیص آبستنی در روز ۲۴		Pregnancy diagnosis on day 30 تشخیص آبستنی در روز ۳۰	
	P4 kit کیت پروژسترون	Nano –kit کیت نانو	Commercial kit کیت تجاری	Nano –kit کیت نانو
A	26	25	25	24
B	9	4	3	3
C	19	24	24	26
D	0	1	2	1
Sensitivity (%) حساسیت	100	96	92	96
Specificity (%) اختصاصیت	67	85	88	89
Positive predictive value (%) ارزش پیش‌بینی مثبت	74	86	89	88
Negative predictive value (%) ارزش پیش‌بینی منفی	100	96	92	96
Overall accuracy (%) دقت کلی	83	90	90	92

A: تشخیص درست آبستنی؛ ب: تشخیص نادرست آبستنی؛ C: تشخیص درست غیر آبستنی؛ D: تشخیص نادرست غیر آبستنی.

A: diagnosis of pregnancy corrects; B: diagnosis of pregnancy incorrect; C: diagnosis of no pregnancy corrects; D: diagnosis of no pregnancy incorrect. Sensitivity = 100 × a/a + d; specificity = 100 × c/c + b; positive predictive value = 100 × a/a + b; negative predictive value = 100 × c/c + d.; overall accuracy = a + c/a + b + c + d × 100.

روش‌های استفاده‌شده در تشخیص آبستنی در دامداری‌های مختلف بسته به اهداف دامدار و شرایط دامداری متفاوت است و اغلب از روش لمس راست‌روده و یا در صورت دسترسی به تجهیزات سونوگرافی و تکنسین مجرب این روش را انتخاب می‌کنند و بیشتر

دامداران منتظر برگشت دام به چرخه فحلی هستند و از هیچ روشی استفاده نمی‌کنند. یکی از دلایل عدم استفاده دامدار از روش‌های تشخیص آبستنی می‌تواند عدم آگاهی از ضرر و زیان‌های تأخیر در آبستنی باشد و عامل بعدی پیچیده بودن روش‌های تشخیصی و تجهیزات و تکنسین موردنیاز در تشخیص آبستنی است (۱۶). با توجه به اهمیت تشخیص سریع‌تر آبستنی در گله‌های دام، هر روش تشخیص آبستنی باید با روش دقیق سونوگرافی مقایسه شود و محدودیت هر دو روش باید در نظر گرفته شود. تشخیص آبستنی بر اساس غلظت PAG در روز ۳۱ پس از تلقیح نشان داد که به لحاظ دقت قابل‌مقایسه با روش سونوگرافی در روز ۳۱ آبستنی است (۱۲، ۱۹، ۲۲). زودترین زمان ممکن برای تشخیص آبستنی با استفاده از سونوگرافی حدود روز ۳۰ پس از تلقیح گزارش‌شده است. با توجه به محدودیت‌های مربوط به روش سونوگرافی (هزینه‌ها و تکنسین مجرب) استفاده از روشی جایگزین موردنیاز است.

تشخیص سریع‌تر وضعیت آبستنی در دام سبب می‌شود پس از شناسایی گاوهای غیرآبستن و در صورت تکرار پروتکل همزمان‌سازی تخمک‌ریزی در دام، نرخ آبستنی در گله افزایش یابد و از طرفی با کاهش روزهای باز، روزانه از ضرر و زیان اقتصادی که به دلیل تأخیر در آبستنی به دامدار تحمیل می‌شود، جلوگیری کند. نتایج دقت فحل-یابی و تأثیرات اقتصادی آن در گاوداری نشان داد برای یک گاو که در اوج شیردهی ۲۵ کیلو شیر تولید می‌کند به ازای هر روز تأخیر در آبستنی از روز ۸۵ تا ۱۰۰ پس از زایش، ۴۰۵۹۱ ریال زیان به گاودار وارد خواهد شد و اگر آبستنی بین روزهای ۱۴۶ تا ۱۷۵ رخ دهد این زیان به حدود ۶۰۱۲۱ ریال افزایش خواهد یافت (این اطلاعات مربوط به سال ۱۳۸۴ است که قیمت هر لیتر شیر ۲۷۰۰ ریال بود)(۱۱). در مطالعات دیگری که در سال ۱۳۹۲ انجام شد زیان ناشی از تأخیر در آبستنی در گاوهای شیری با حداکثر تولید ۴۵ کیلوگرم شیر، در اولین ماه پس از روز ۱۱۰ پس از زایمان، به ازای هر روز ۲۵۴۰۰۵ ریال گزارش‌شده است (۲۱). در حال حاضر در اغلب گاوداری‌ها از روش-های سنتی تشخیص آبستنی مانند بروز فحلی و لمس راست‌روده (حدود روز ۴۵ آبستنی) و در برخی از مزارع صنعتی از روش سونوگرافی (حدود روز ۳۰ آبستنی) استفاده می‌شود. با توجه به نتایج این مقاله احتمال تشخیص آبستنی و از دست رفتن آبستنی بر اساس غلظت گلیکوپروتئین‌های مرتبط با آبستنی در روز ۲۴ پس از تلقیح وجود دارد. با کاهش زمان تعیین وضعیت آبستنی از روز ۳۰ به روز ۲۴ (۶ روز)، می‌توان از ضرر و زیان اقتصادی روزانه ۲۵۴۰۰۵ ریال (بر اساس نتایج منتشر شده در سال ۱۳۹۲) به ازای هر گاو جلوگیری کرد. این مبلغ به دلیل تأخیر در آبستنی مجدد و مربوط به هزینه نگهداری گاو است و در مزارع صنعتی پرورش گاو که تعداد زیادی گاو نگهداری می‌شوند، این مبلغ بسیار چشمگیر است.

بر اساس نتایج این مطالعه، توانایی تشخیص حیوانات غیرآبستن با استفاده از غلظت PAG1 در روز ۲۴ امکان‌پذیر است زیرا با کاهش غلظت آن در این روز احتمال سقط‌جنین وجود دارد. بااین‌حال بررسی غلظت PAG1 در روز ۲۴ به عنوان یک روش تشخیصی زودهنگام غیرآبستنی نیاز به بررسی بیشتر دارد چراکه بر اساس گزارش‌های منتشرشده میزان از دست رفتن آبستنی از روز ۲۴ تا ۳۱ آبستنی ۲۰/۸ درصد و از روز ۳۱ تا ۶۰ آبستنی حدود ۱۹/۸ در صد است (۱۸). بااین‌حال علت مرگ‌ومیر جنین در بازه زمانی ۲۴ تا ۳۰ و ۳۱ تا ۶۰ آبستنی هنوز مشخص نشده است و مطالعات زیادی در این زمینه انجام‌شده است و تلاش‌ها برای یافتن دلایل آن همچنان ادامه دارد. در رابطه با ارتباط غلظت پروژسترون و PAG1 با مرگ جنین نیز مطالعاتی انجام شد. نتایج این مطالعات نشان داد که غلظت پروژسترون در قبل و بعد انتقال جنین هیچ ارتباطی با مرگ جنین نداشت درحالی‌که غلظت PAG1 ارتباط مثبتی با زنده‌ماندن جنین داشت (۴، ۱۸). البته این یک امری طبیعی است چراکه پروژسترون معیاری غیرمستقیم از آبستنی است و PAG1 به‌عنوان معیار مستقیمی از وضعیت آبستنی است و تنها در صورت آبستنی دام از جفت ترشح می‌شود، درحالی‌که غلظت پروژسترون در فاز لوتئال و در دام غیر-آبستن نیز افزایش می‌یابد و بیانگر فعالیت جسم زرد است. البته عوامل دیگری نظیر عفونت رحم و وجود فولیکول‌های کیستی لوتئینه شده نیز سبب افزایش غلظت پروژسترون در خون گاو می‌شوند. مطالعه دیگری گزارش کرد که غلظت PAG1 زودتر از پروژسترون کاهش می‌یابد و این نشان می‌دهد که مرگ رویان زودتر از پس‌روی جسم زرد اتفاق می‌افتد (۱۸). بنابراین مطابق با نتایج این مطالعه، کاهش غلظت PAG1 در روز ۲۴ در گاوهایی که تا روز ۳۰ آبستن نمی‌مانند نیز می‌تواند با مرگ زودهنگام جنین ارتباط مستقیمی داشته باشد. بااین‌حال استفاده از غلظت PAG1 در روز ۲۴ به‌منظور مشخص شدن وضعیت آبستنی و پیش‌بینی احتمال مرگ جنین در این بازه زمانی می‌تواند علاوه بر کاهش روزهای باز، به ورود زودتر گاو به وضعیت آبستنی و یا تلقیح مجدد کمک کند و از زیان اقتصادی که به دلیل تأخیر در آبستنی به دامدار تحمیل می‌شود، جلوگیری کند. البته به دلیل متفاوت بودن غلظت PAG1 در دام‌های مختلف و نژادهای مختلف انجام مطالعات بیشتر در دام‌هایی با شرایط متفاوت و در نژادهای مختلف موردنیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکیت به دلیل حساسیت بیشتر می‌تواند غلظت‌های کمتر PAG1 (۰/۰۳ ng/mL) را که در هفته سوم پس از تلقیح توسط سلول‌های ترفوبلاست جفت تولید و به داخل خون ترشح می‌شود را اندازه‌گیری کند. روند تغییرات غلظت PAG1 نشان داد که غلظت PAG1 به‌طور وابسته به روز از روز ۲۰ تا ۳۰

پس از تلقیح سیر صعودی دارد. اولین افـزایش در غلظـت PAG1 در گاوهای آبستن در روز ۲۳ پس از تلقیح اتفاق می‌افتد. همچنین غلظت PAG1 در روز ۲۴ پس از تلقیح می‌تواند به‌عنوان شاخصـی از تعیـین وضعیت آبستنی باشد. کاهش غلظت PAG1 در روز ۲۴ پس از تلقیح می‌تواند نشانه‌ای از مرگ زودهنگام جنین باشد و بـه‌عنـوان شـاخص پیش‌بینی مرگ جنین مورداستفاده قرار گیرد.

منابع

1- Aires, M., K. Dekagi, V. Dantzer, and A. Yamada. 2014. Bovine placentome development during early pregnancy. Pages 390–396 in Microscopy: Advances in Scientific Research and Education. A. Méndez-Vilas, ed. Formatex, Badajoz, Spain.

2- Ambrose, D. J., J. P. Kastelic, R. Corbett, P. A. Pitney, H. V. Petit, J. A. Small, and P. Zalkovic. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in a-linolenic acid. Journal of Dairy Science, 89 (8): 3066–3074.

3- Barański, W., S. Zduńczyk and T. Janowski. 2012. Late embryonic and foetal losses in eight dairy herds in north-east Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences, 15 (4): 735-739.

4- Breukelman, S. P., Z. Perenyi, M. A. Taverne, H. Jonker, G.C. Weijden, P.L. Vos, L. de Ruigh, S.J. Dieleman, J.F. Beckers and O. Szenci. 2012. Characterization of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy associated glycoprotein-1 concentrations. Veterinary Journal, 194 (1): 71–76.

5- Chaffaux, S., G.N.S. Reddy, F. Valon and M. Thibier. 1986. Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosing pregnancy and for monitoring embryonic mortality in dairy cattle. Animal Reproduction Science, 10 (3): 193–200.

6- El Amiri, B., N. M. Sousa, A. Alvarez Oxiley, D. Hadarbach and J. F. Beckers. 2015. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep. Research in Veterinary Science, 99: 30-36.

7- Green, J. A., T. E. Parks, M. P. Avalle, B. P. Telugu, A. L. McLain, A. J. Peterson, W. McMillan, N. Mathialagan, R. R. Hook, S. Xie and R. M. Roberts. 2005. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. Theriogenology, 63 (5):1481–1503.

8- Green, J. A., S. Xie, X. Quan, B. Bao, X. Gan, N. Mathialagan, J. F. Beckers and R. M. Roberts. 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. Biology of Reproduction, 62 (6):1624–1631.

9- Guirado Dantas, F., K. E. Zechiel, S. T. Reese, G. A. Franco, J. D. Rhinehart and K. G. Pohler. 2016. Using Pregnancy-Associate Glycoprotein (PAG) on Day 24 as Marker for Pregnancy on Beef Cattle. Journal of Animal Science, 95 (1): p.14. (Abstract).

10- Hernandez, J. A., C. A. Risco, F. S. Lima and J. E. P. Santos. 2012. Observed and expected combined effects of clinical mastitis and low body condition on pregnancy loss in dairy cows. Theriogenology, 78 (1): 115–121.

11- Kafi, M., M. Zibaei and A. Rahbari. 2007. Accuracy of estrous detection in cows and its economic impacts on Shiraz dairy farms. Iranian Journal of Veterinary Research, 8 (2): 131-137. (In Persian).

12- Karen, A., N. M. Sousa, J. F. Beckers, A. C. Bajcsy, J. Tibold, I. Madl and O. Szenci. 2015. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test forearly pregnancy diagnosis in dairy cattle. Animal Reproduction Science, 159: 31–37.

13- Lawson, B. C., A. H. Shahzad, K. A. Dolecheck, E. L. Martel, K. A. Velek, D. L. Ray, J. C. Lawrence and W. J. Silvia. 2014. A pregnancy detection assay using milk samples: Evaluation and considerations. Journal of Dairy Science, 97 (10): 6316–6325.

14- Lopez-Gatius, F., J. M. Garbayo, P. Santolaria, J. Yaniz, A. Ayad, N. M. de Sousa and J. F. Beckers. 2007. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. Domestic Animal Endocrinology, 32 (1): 29–42.

15- Nourani, S., H. Ghourchian and S. M. Boutorabi. 2013. Magnetic nanoparticle-based immunosensor for electrochemical detection of hepatitis B surface antigen. Analytical Biochemistry, 441 (1): 1–7.

16- Pohler, K., T. Geary, C. Johnson, J. Atkins, E. Jinks, D. Busch, J. A. Green, M. D. MacNeil and M. F. Smith. 2013. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. Journal of Animal Science, 99 (2): 1584-1594.

17- Pohler, K. G., J. A. Green, T. W. Geary, R. F. G. Peres, M. H. C. Pereira, J. L. M. Vasconcelos and M. F. Smith. 2015. Predicting Embryo Presence and Viability. Rodney D. G. and Fuller W. B. ed. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology. 216: 253-270.

18- Pohler, K. G., M. H. Pereira, F. R. Lopes, J. C. Lawrence, D. H. Keisler, M. F. Smith, J. L. Vasconcelos and J. A. Green. 2016. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. Journal of Dairy Science, 9 (2): 1584-1594.

19- Reese, S., M. Pereira, J. Vasconcelos, M. Smith, J. Green and T. Geary. 2016. Markers of pregnancy: How early

can we detect pregnancies in cattle using pregnancy-associated glycoproteins (pags) and micrornas? Animal Reproduction, 13 (3): 200-208.

20- Reese, S. T., M. C. Pereira, J. L. Edwards, J. L. Vasconcelos and K. G. Pohler. 2018. Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation, Theriogenology, 106:178-185.

21- Rezaee Roodbari, A., h. Kohram and I. Dirandeh. 2015. Evaluating economic losses associated with delayed conception in dairy cows. Iranian Journal of Animal Science, 46 (2): 151-158. (In Persian).

22- Ricci, A., P. D. Carvalho, M. C. Amundson, R. H. Fourdraine, L. Vincenti and P. M. Fricke. 2015. Factors associated with pregnancy associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. Journal of Dairy Science, 98 (4): 2502–2514.

23- Sasser, R. G., C. A, Ruder., K. A, Ivani., J. E, Butler., and W. C. Hamilton.1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. Biology of Reproduction, 35: 936–942.

24- Silva, E., R. A. Sterry, D. Kolb, N. Mathialagan, M. F. McGrath, J. M. Ballam and P. M. Fricke. 2009. Effect of interval to resynchronization of ovulation on fertility of lactating Holstein cows when using transrectal ultrasonography or a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose pregnancy status. Journal of Dairy Science, 92 (8): 3643–3650.

25- Szenci, O., J. F. Beckers, P. Humblot, J. Sulon, G. Sasser, M. A. Taverne, J. Varga, R. Baltusen and G. Schekk. 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. Theriogenology, 50 (1): 77-88.

26- Touzard, E., P. Reinaud, O. Dubois, C. Guyader-Joly, P. Humblot, C. Ponsart and G. Charpigny. 2013. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern pag in bovine placenta during pregnancy. Reproduction, 146 (4): 347-362.

27- Wallace, R. M., K. G. Pohler, M. F. Smith and J. A. Green. 2015. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. Reproduction, 149 (3): 115-126.

28- Zhang, H., M. Xiaoming, H. Shuisheng, L. Yue G. Longhua, Q. Bin, L. Zhenyu and C. Guonan. 2016. Highly sensitive visual detection of Avian Influenza A (H7N9) virus based on the enzyme-induced metallization. Biosensors and Bioelectronics, 79: 874–880.

29- Zhou, C. H., J. Y. Zhao, D. W. Pang and Z. L. Zhang. 2014. Enzyme-Induced Metallization as a Signal Amplification Strategy for Highly Sensitive Colorimetric Detection of Avian Influenza Virus Particles. American Chemical Society, 86 (5): 2752−2759.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 1, Spring 2019, p. 121-132

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۱۳۲-۱۲۱

Enhancement of Pregnancy-Associated Glycoprotein ELISA Kit Sensitivity for Early Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows

A. Ayyoubi[1]- M. Shakeri[2*]- M. Zhandi[3]- H. Ghourchian[4]

Received: 16-04-2018
Accepted: 10-07-2018

Introduction Early pregnancy diagnosis is a key factor in shortening the calving interval through identifying the non-pregnant animals to rebreed them at the earliest time after artificial insemination (AI). Bovine pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) are produced by mono- and binucleated trophoblastic cells of the pregnant cow's placenta. Detection of PAG in the maternal circulation has been used to accurately diagnose pregnancy. Several studies have used commercial PAG tests to determine pregnancy status in dairy cows and heifers. Pregnancy-specific protein B (PSPB) or PAG1 was the first identified member of the PAG family and commercial diagnostic kits still utilize PAG1 as a pregnancy marker. In recent years, the use of nanoparticles in immunosensors has been increased their sensitivity and increased the traceability of antigen-antibody responses. Due to the limitation of using ultrasound and other methods for pregnancy diagnosis in the first 30 days after inoculation, the aim of this study was to apply the pregnancy-associated glycoprotein detection method in order to reduce the time of pregnancy diagnosis. For this purpose, a sandwich ELISA immunosensor was designed for the detection of PAGs and named Nano-kit.

Materials and Methods Magnetic nanoparticles were used to enhance the contact area between antibodies and antigens. Streptavidin and biotin were used for their high binding affinity to bind the antibodies and enzymes to nanomagnet. The synchronization technique and artificial insemination (AI) was performed in Holstein dairy cows (n = 58). Pregnancy status was determined by transrectal ultrasonography (30 days after AI). Furthermore, transrectal palpation was carried out by a skilled veterinarian on day 60 after AI to determine the pregnancy status of cows which were previously detected as pregnant. For PAG1 analysis, blood samples (10 mL) were collected daily from 18 to 30 days after AI. Blood samples were collected by venipuncture from the tail vein into evacuated tubes containing EDTA as an anticoagulant and were processed 1–3 h after sampling. The samples were centrifuged and plasma samples were transferred to fresh tubes and were stored at −20°C until they were assessed. Plasma concentrations of PAG1 were determined by nano- kit and commercial kit. Differences in the level of PAG-1 were evaluated by repeated measures ANOVA (SAS 9.4) over days of sampling (18 to 30). Values of PAG-1 in pregnant cows were considered as the reference. Data were presented as means ± SD and differences were considered significant at $P<0.05$.

Results and Discussion By doing Ovsynch protocol, of the 54 cows enrolled in the first AI, 48% (26/54) of synchronized cows were diagnosed pregnant 30 days after AI using transrectal ultrasonography. From day 30 to 60 after AI, 73% (19/26) of cows maintained pregnant and the pregnancy loss from day 32 to 60 after AI was 17% (7/26). Measurement of different concentrations of PAG1 (standards) using a commercial kit and nano-kit showed that nano-kit were more sensitive than the commercial kit and detected a concentration of 0.03 ng/mL. The first increase in plasma concentration of PAG1 occurred on d 23 after AI in pregnant cows and PAG1 concentration in serum increased from d 22 to 30 after AI and it was affected by day ($P < 0.001$). Cows diagnosed as pregnant on day 60 after AI had a higher PAG concentration on day 24 compared with cows that were diagnosed as non-pregnant (2.28 ± 0.15 ng/mL vs 0.7 ± 0.18 ng/mL, respectively; $P < 0.001$). Accuracy in predicting pregnancy at day 24 of gestation based on circulating concentration of PAGs was 95 % for 1.93 ng/mL. Generally, based on the results of this study, the cows with mean PAG1 concentration more than 2.28 ± 0.07 ng/mL on 24 and mean PAG1 concentration more than 9.2 ± 0.07 ng/mL on day 30 of pregnancy, remained pregnant until day 60 of pregnancy. Furthermore, in cows diagnosed pregnant on day 24 of pregnancy but were not pregnant on day 30 after AI, blood plasma PAG1 concentration on day 24 after AI was 1.03 ± 0.66 ng/ml.

Conclusion Based on these results, PAG concentrations at day 24 of gestation are higher in pregnant compared to non-pregnant dairy cows and could be applied in diagnosing pregnancy at day 24 of gestation; however, further study is needed to determine the potential of PAG1 in pregnancy diagnosis in dairy cows.

Key words: Abortion, Glycoprotein, Nano-kit, Pregnant cow.

1, 2 and 3 Ph.D. Student, Assistant Prof. and Associate Prof. Department of Animal Sciences, University of Tehran, Iran,
4 -Professor of Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Iran.
(*- Corresponding Author Email: mshaker@ut.ac.ir)